

R3

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-286953
 (43)Date of publication of application : 31.10.1995

(51)Int.Cl. G01N 15/14
 G01N 15/02
 G01N 21/64
 G01N 33/49

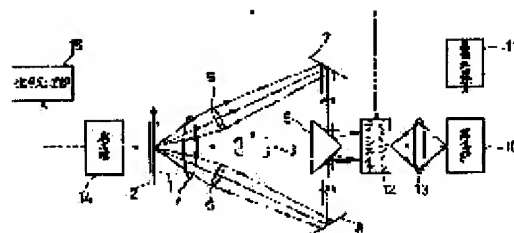
(21)Application number : 06-080509 (71)Applicant : TOA MEDICAL ELECTRONICS CO LTD
 (22)Date of filing : 19.04.1994 (72)Inventor : MAEKAWA YASUNORI
 KOSAKA TOKIHIRO

(54) IMAGING FLOW SIGHT METER

(57)Abstract:

PURPOSE: To accurately grasp minute luminous points distributed in a particle three-dimensionally accurately, and to accomplish an accurate counting, by photographing plural different luminous images to a single particle.

CONSTITUTION: By leading in a sample solution 2 a fluorescent mark is applied to a flow cell 1, the cells (particles) of the sample flow included in a sheath solution flow by lining up in one line, and when they are in the photographing area in the flow cell 1, a light source 3 is excited. And an excited single cell is photographed from two different directions. That is, a fluorescent image passing through a lens 4, and obtained by object lenses 5 and 6 are reflected by mirrors 7 and 8 respectively, they are reflected again 9, and the images are formed on the photoelectric screen of an image intensifier (I. I) 12. The I. I 12 amplifies the two faint fluorescent image in several ten thousand times, and they are photographed by a video camera 10. An image processor 11 inputting the resultant video signal carries out the counting of the number of fluorescent luminous points, the calculation of the fluorescent luminous amount, and the like. Consequently, the luminous points distributed in the cell three-dimensionally can be discriminated, and the luminous points can be counted accurately.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-286953

(43) 公開日 平成7年(1995)10月31日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 15/14	D			
	C			
15/02	B			
21/64	Z			
33/49	A			

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平6-80509

(22) 出願日 平成6年(1994)4月19日

(71) 出願人 390014960

東亜医用電子株式会社

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号

(72) 発明者 前川 泰範

神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東亜医用電子株式会社内

(72) 発明者 小坂 時弘

神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東亜医用電子株式会社内

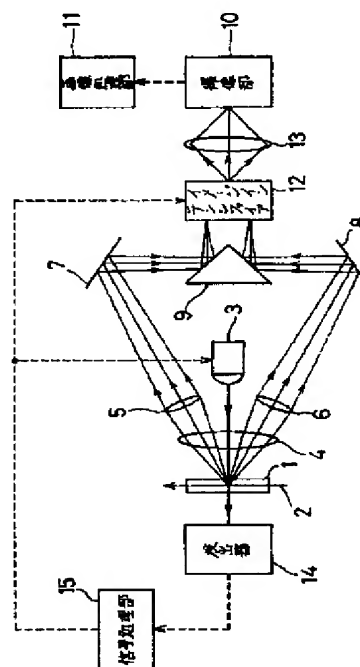
(74) 代理人 弁理士 野河 信太郎

(54) 【発明の名称】 イメージングフローサイトメータ

(57) 【要約】

【目的】 一つの粒子に対して、異なる複数の蛍光像を撮像することにより、粒子内に三次元的に分布している発光点をもれなく撮像する。

【構成】 粒子を含む試料液が内部に流動される光透過性のフローセルと、フローセルの撮像領域に存在する粒子の発光像を撮像する撮像手段を備え、撮像手段が、一つの粒子に対して、異なる像を撮像する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子を含む試料液が内部に流動される光透過性のフローセルと、

フローセルの撮像領域に存在する粒子の蛍光像を撮像する撮像手段を備え、

撮像手段が、一つの粒子に対して、異なる像を撮像することを特徴とするイメージングフローサイトメータ。

【請求項2】 撮像手段が、一つの粒子に対して、複数方向から複数の粒子像を撮像することを特徴とする請求項1記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項3】 撮像手段が、一つの粒子に対して、焦点位置の異なる複数の粒子像を同時に撮像することを特徴とする請求項1記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項4】 撮像手段が、一つの粒子に対して、焦点位置の異なる複数の粒子像を時間的にずらして撮像することを特徴とする請求項1記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項5】 フローセルの撮像領域に蛍光励起用の光を照射する蛍光励起光源をさらに備え、撮像手段が、フローセルの撮像領域に存在する粒子の蛍光像を撮像することを特徴とする請求項1記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項6】 蛍光励起光源が、パルス発光タイプの光源からなる請求項5記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項7】 蛍光励起光源が、連続発光タイプの光源からなり、撮像手段が、撮像手段に入る光路を開閉するゲート手段を備えてなる請求項5記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項8】 監視用光源と、その監視用光源からの光によりフローセルの撮像領域を粒子が通過することを検出する検出器からなる粒子通過監視系をさらに備えてなる請求項6または7記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項9】 蛍光励起光源が、監視用光源を兼ねていることを特徴とする請求項8記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項10】 試料液に含まれる粒子が、蛍光を誘発させる試薬で処理されていることを特徴とする請求項5記載のイメージングフローサイトメータ。

【請求項11】 フローセル内の試料液の流れが、偏平なシーズ流として形成され、蛍光励起光源の光が、そのシーズ流の幅の狭い方向から照射されることを特徴とする請求項5記載のイメージングフローサイトメータ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、イメージングフローサイトメータに関する。さらに詳しくは、細胞や微生物内のある特定の物質を検出するために、例えば、蛍光染

色あるいは蛍光標識されたモノクローナル抗体やDNAプローブと反応処理させた細胞や微生物の懸濁液（これを「試料液」という）を細いガラス管内に導いて、フロー方式で細胞や微生物等の蛍光像を撮像し、分析を行うイメージングフローサイトメータに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、癌や遺伝病等の診断あるいは細胞動態の解析のために、分子生物学的な解析、検査がさかんに行われている。例えば、細胞や血球等に含まれるある特定の物質（DNA、増殖抗原、表面抗原、癌遺伝子産物等）の検出あるいは染色体の数的異常を検査することを目的として、モノクローナル抗体や染色体特異的DNAプローブ等を蛍光標識した特異反応試薬を用いて細胞を処理し、その細胞の蛍光像を蛍光顕微鏡を用いて鏡検することが行われている。

【0003】また、医薬品や食品添加物等の安全性評価のために、染色体の異常から生じる断片（小核）の有無を調べるための小核試験が行われている。この小核試験においては、赤血球内に残留した小核を蛍光染色し、小核の有無を蛍光顕微鏡等を用いて検査している。さらに、白血球の食食能を検査するために蛍光物質で標識したビーズを白血球に食食させ、蛍光像よりビーズの個数を計算することも行われている。

【0004】従来、これらの測定は蛍光顕微鏡を用いて行われており、多数の細胞や血球の測定を行う場合には、非常に時間と手間のかかるものであった。このような蛍光顕微鏡を用いて測定を行う際、スライドガラス上に細胞が伸展している場合は、被写界の焦点深度の浅さはそれほど大きな問題とはならない。しかし、スライドガラスに細胞の浮遊液を封入した試料を測定する場合は、測定者が顕微鏡のフォーカスを変化させながら細胞の光軸に沿った方向をまんべんなく観察することによって、被写界の焦点深度の浅さをカバーするようにしていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】最近、上記のような解析や検査を、蛍光顕微鏡と画像処理装置とを組み合わせた装置で自動化することが試みられている。しかしながら、このような装置で多数個の細胞を解析するには時間がかかる。また、従来のフローサイトメータ（「FCM」とも記す）による測定も試みられているが、この方法では、蛍光を発している部位の局在を知ることができない。しかも、検出したい特異物質が存在している所以外の部位からの背後蛍光（非特異蛍光）が測定精度に影響を与えるという問題があり、まだ実用化されるに至っていない。

【0006】このような問題を解決するために、蛍光像撮像型イメージングフローサイトメータ（「IFCM」とも記す）という装置が実用化されている。この装置は、ある特異的な蛍光染色あるいは蛍光標識されたモ

ノクローナル抗体やDNAプローブと反応処理させた細胞や微生物の懸濁液を細いガラス管内に導いて、フロー方式でその細胞や微生物の蛍光像を撮像し、分析を行う装置である。

【0007】しかしながら、この装置で上記のような測定を行う場合、細胞内に三次元的に分布している発光点を精度よく測定するのは、その被写界の焦点深度の浅さのために困難である。

【0008】それゆえ、被写界の焦点深度の浅さを克服するための種々の方法が試みられている。例えば、光学的に焦点深度を向上させる（深くさせる）方法がある。これは、結像系のNAをできるだけ小さく設定する方法である（例えば、NAを“0.25”とした場合は被写界の焦点深度は12 μ m以上である）。しかし、この方法では、例えば二個の発光点が光軸方向に並んでいる場合は、それらが重なってしまうので一つの発光点として観察され、三次元的な分解能が確保できない。すなわち発光点の正確な計数ができず、測定精度が低下することになる。

【0009】なお、本発明の関連技術として、1989年発行のHUMAN CELL 2(4)の436頁から438頁に、FISH (FLUORESCENCE in situ HYBRIDIZATION) による染色体異常検出の検討についての開示がある。これにおいては、「間期の細胞で染色体異常を検出するために染色体特異的のプローブを用いてFISHを行った。抹消血リンパ球において11番染色体特異的のプローブでは2個のspotが多く認められた。一方、X染色体特異的のプローブでは男性は1個、女性では2個のspotを認めた。またHeLa細胞では11番、Xともに3個のspotを認めた。これらの結果より染色体特異的のプローブを用いたFISHは染色体異常検出のためには有用で信頼性の高い方法であると考えられた。」と記載されている。

【0010】また、1982年発行のCell Analysis Vol. 1の306頁から313頁には、一つの細胞に対して、焦点位置の異なる複数の粒子像を時間的にずらして撮像することが開示されている。

【0011】

【課題を解決するための手段およびその作用】この発明の目的は、染色体の数的異常の検査や、医薬品の安全性評価のための小核試験等に用いられる検査装置、あるいは白血球の貪食能の検査装置として応用する場合に必要な蛍光像の分解能を確保するために、一つの細胞（粒子）に対して、異なる複数の発光像（例えば蛍光像や化学発光像）を撮像し、一枚の画面に複数の発光像を得て、画像解析を行うことにより、細胞内に三次元的に分布している微小な発光点を確実に捉えて、正確に計数できるようにしたイメージングフローサイトメータを提供することにある。この場合、細胞（粒子）に化学発光のための処理を施し、化学発光像を撮像してもよい。

【0012】この発明によれば、粒子を含む試料液が内

部に流動される光透過性のフローセルと、フローセルの撮像領域に存在する粒子の発光像を撮像する撮像手段を備え、撮像手段が、一つの粒子に対して、異なる像を撮像することを特徴とするイメージングフローサイトメータが提供される。

【0013】この発明の最も特徴とする点は、粒子の発光像を撮像する際に、一つの粒子に対して、異なる像を撮像することにある。すなわち、異なる方向から、あるいは異なる焦点位置で一つの粒子に対して複数の像を撮像し、これにより、細胞内に三次元的（立体的）に分布している染色体、小核、ビーズなどの発光点をもれなく撮像する点にある。粒子の発光像とは、蛍光像や化学発光像のことを意味する。

【0014】この発明において、フローセルとしては、フローセルの外側から粒子を撮像することが可能な、例えば、ガラスやプラスチック製の光透過性の管が適用される。

【0015】このフローセルとしては、断面が円形（丸シース）あるいは矩形、長方形あるいは楕円形（平面シース）などの各種の形状のものをを用いることができるが、粒子を鮮明に撮像するためには、粒子に対して焦点の位置を安定させて、粒子を重ねることなく1つずつ撮像する必要がある。したがって、このような点から、粒子を分離状態で、さらに偏平な粒子であればその粒子が撮像方向に対して正面を向くように配向させて流動させることのできる、断面形状が長方形あるいは楕円形の平面シースフローセルを用いることが適している。このような平面シースフローセルとしては、約50～300 μ m程度の幅とその1/10程度の厚みの偏平な試料液流を形成することが可能な公知のフローセルを用いることができ、これには、例えば、特開平3-105235号公報に記載のものなどを適用することができる。

【0016】フローセル内に導入される試料液としては、主として、微生物や、血液あるいは尿などを任意に希釈した試料液が適用される。粒子は、フローセルの内部に導入可能な大きさのものであればよく、材質、比重、形状等に特に限定はない。この粒子としては、微生物や、血液中に含まれる血球、尿中に含まれる細胞などが適用される。

【0017】撮像手段としては、フローセルの撮像領域に存在する粒子の発光像を撮像することができるとのものであればよく、例えば、市販のビデオカメラを利用することができる。

【0018】このような構成により、三次元的に分布している染色体、小核、ビーズなどの粒子内の微小な発光部を見落とすことなく撮像することができ、精度の高い測定を行うことが可能となる。

【0019】この発明のイメージングフローサイトメータにおいては、撮像手段を、一つの粒子に対して、複数方向から複数の粒子像を撮像するように構成してもよ

い。また、一つの粒子に対して、焦点位置の異なる複数の粒子像を同時に撮像するように構成してもよい。あるいは、一つの粒子に対して、焦点位置の異なる複数の粒子像を時間的にずらして撮像するように構成してもよい。

【0020】また、この発明のイメージングフローサイトメータにおいては、フローセルの撮像領域に蛍光励起用の光を照射する蛍光励起光源を設けて、撮像手段を、フローセルの撮像領域に存在する粒子の蛍光像を撮像するように構成することができる。

【0021】この場合の蛍光励起光源としては、粒子の蛍光像を得ることができる程度の光をフローセルの撮像領域に照射することが可能な各種の光源を用いることができるが、粒子の存在する狭い撮像領域に光を集めて照射するという観点からは、光を集束させることが容易で、かつ高い光強度を得ることのできるレーザ光源を用いることが適している。

【0022】この光源は、粒子をブレなく撮像するためには、パルス発光タイプの光源を用いるのが好ましい。ただし、連続発光タイプの光源を用いることも可能であるが、その場合には、撮像手段に入る光路を開閉するゲート機能を有する光シャッター（電子シャッター）を配置して、粒子をブレなく撮像する。また、撮像する光像の強度を増大させる必要がある場合には、ゲート機能を有するイメージンシファイアを撮像手段の手前に配置する。

【0023】さらに、この発明のイメージングフローサイトメータにおいては、粒子を効率良く撮像するために、粒子通過監視系を付加し、粒子が撮像領域に入ったことを確認した上で粒子を撮像するようにすることが適している。

【0024】この粒子通過監視系としては、常時発光する監視用光源と、その監視用光源からの光によりフローセルの撮像領域を粒子が通過することを検出する検出器からなる粒子通過監視系が適用される。監視用光源としては、LD、LED、SLD等の連続発光タイプの光源を用いることができる。

【0025】この発明のイメージングフローサイトメータに、このような粒子通過監視系をさらに設ける場合、蛍光励起用光源として連続発光タイプの光源を用いている時には、この光源を粒子通過監視系の監視用光源として兼用することができる。

【0026】この発明のイメージングフローサイトメータにおいては、試料液に含まれる粒子を、あらかじめ蛍光を誘発させるための試薬で処理しておくことが好ましい。この試薬は、細胞や血球等に含まれる特定の物質（DNA、増殖抗原、表面抗原、癌遺伝子産物等）を検出するための特異反応試薬である、モノクローナル抗体や染色体特異的DNAプローブなどを蛍光染色あるいは蛍光標識するためのものであり、通常、FITCや、P

I（プロピディウムイオダイド）などが用いられる。

【0027】この場合、光源は、フローセルの撮像領域に、蛍光を励起する蛍光励起用の光を照射できるものが用いられる。この蛍光励起用の光としては通常のレーザ光を用いることもできる。また、このようにして蛍光を励起し、撮像手段により、フローセルの撮像領域に存在する粒子の蛍光像を撮像する。

【0028】試薬処理なしで光を発する細胞などの粒子を対象とする場合には、上記試薬処理は不要である。また、光照射なしでみずから光を発する粒子を対象とする場合には、光の照射は不要である。例えば、試薬として化学発光を誘発させるための試薬で処理し、粒子の化学発光像を撮像してもよい。このような化学発光の場合には、光源は不要である。

【0029】この発明のイメージングフローサイトメータにおいては、上記したように、フローセル内の試料液の流れを、扁平なシース流として形成することが好ましく、その場合には、そのシース流の幅の狭い方向から蛍光励起用光源の光を照射するように構成することが好ましい。

【0030】つまり、蛍光励起用の光は、撮像領域の縦方向より十分に大きな長径と、撮像する粒子の厚さより十分に大きな短径を持った楕円形状の照射領域で、撮像領域における照射強度が均一になるように照射することが望ましい。

【0031】このようにすることにより、フローセルの厚み方向に励起光を絞ることができるので、励起光の単位面積当たりの照射強度を上げることができ、よりS/N比の良い蛍光像を得ることができる。

【0032】

【実施例】以下、図面に示す実施例1～3に基づいてこの発明を詳述する。なお、これによってこの発明が限定されるものではない。

【0033】実施例1

図1はこの発明によるイメージングフローサイトメータの実施例1の構成を示す説明図である。

【0034】このイメージングフローサイトメータは、微生物や、血液あるいは尿などを希釈した試料液（サンプル液ともいう）をフローセルと呼ばれる透明なガラス管中に導いて試料流（サンプル流ともいう）を形成し、この試料流に対し、ストロボ光やパルスレーザ光のようなパルス光か、又は連続光を照射して、血液に含まれる血球や尿に含まれる細胞のような粒子（被検粒子と称すこともある）の蛍光像や、あるいは透過光像などをビデオカメラで撮像する装置である。

【0035】以下、被検粒子をその代表例である細胞として表現するが、細胞だけに限定されるものではなく、微生物や、血液に含まれる血球なども含むものとする。本実施例では、一つの細胞に対して異なる二方向から2つの蛍光像を同時に撮像することを特徴としてい

る。

【0036】図1において、1はガラスやプラスチックなどの透明で偏平な管からなるフローセルである。このフローセル1中に試料液2が導入されるときには、同時に、その試料液2の周囲を覆うようにしてシース（鞘）液が供給され、試料液2とシース液とが層流となったもの（これを「シースフロー」と称する）がフローセル1内を流れるようになっている。

【0037】このように、フローセル1中に導入された試料液2は、シース液で包み込まれ、流体力学的効果によって試料流が細く絞られ、細胞が1列に並んで流れる。単位時間当たりの試料分析量を上げるためには、流路の縦横比の大きいフローセルを用いる。すなわち、フローセル1としては、粒子を分離状態で、さらに偏平な粒子であればその粒子が撮像方向に対して正面を向くように配向させて流動させることのできる、断面形状が長方形あるいは楕円形の平面シースフローセルを用いて、偏平な試料流を形成するようにしている。フローセル1中の試料流の長手方向の幅は50～300μmで、短手方向、すなわち撮像方向の厚みはその約1/10の5～30μmである。

【0038】フローセル1中の細胞は、細胞中に含まれるある特定の物質（DNA、増殖抗原、表面抗原、癌遺伝子産物等）の検出あるいは染色体の数的異常を検査することを目的として、モノクローナル抗体や染色体特異的DNAプローブ等を蛍光標識した特異反応試薬であらかじめ処理されている。

【0039】3はフローセル1の撮像領域（「撮像エリア」ともいう）に光を照射するための光源である。この光源3からはレーザ光が照射される。フローセル1中の細胞は、上記した細胞中に含まれるある特定の物質や、染色体に結合した蛍光物質が、この光により励起されて、短時間であるが自ら蛍光を発生する（以下、細胞中のこのような特定の物質や染色体を「発光点」あるいは「蛍光発光部」という）。

【0040】なお、光源3から照射される光は蛍光を励起させる光であるのでこの光を「励起光」とも呼ぶ。また、光源3は蛍光を励起させる光を照射するので「励起光源」とも呼ぶ。

【0041】励起光源3は、連続発光タイプの光源であり、CWレーザ光（連続発振レーザ光）を照射可能なレーザ発光装置などから構成されている。励起光は落射方式で照射している。図中、矢印は光の進行方向を示している。

【0042】4はレンズ、5は第1対物レンズ、6は第2対物レンズ、7は第1ミラー、8は第2ミラー、9は第3ミラーである。10はビデオカメラからなる撮像部であり、フローセル1の撮像エリアに存在する細胞の蛍光像を撮像する。すなわち、励起光源3から照射された励起光によって励起された細胞の蛍光像を撮像する。

この撮像部10は、細胞の蛍光像を結像するための、CCDからなる受光面を有している。そして、二つの撮像系から得られた二つの蛍光像を一つのビデオカメラで撮像する。

【0043】11は撮像部10で得られた蛍光像に対して各種の画像処理を行う画像処理部である。この画像処理部11では、例えば、蛍光発光部の数の計測、蛍光発光部の大きさや位置の計測、蛍光発光部の形状（円形度等）の計測、蛍光発光量の算出等を行う。

10 【0044】12は撮像部10に入る光路を開閉するゲート機能（光シャッター機能）を有するイメージインテンシファイア（以下、I. I. と記す）である。このイメージインテンシファイア12は、光の強さを数万倍程度に増幅する光増幅器としての機能を有しており、細胞をブレなく撮像するために、撮像部10の手前に配置され、外部トリガによりゲートを短時間だけ開くようになっている。13はリレーレンズである。このリレーレンズ13には光ファイバーを用いることもできる。

20 【0045】14はフローセル1の撮像エリアを細胞が通過することを検出する細胞通過監視用の検出器である。この検出器14は、一次元イメージセンサ（ラインセンサ）またはフォトダイオードから構成されており、細胞の散乱光を検出する。細胞通過監視用の光源は特に設けておらず、励起光源3の光によって細胞の通過を監視する。すなわち、励起光源3が細胞通過監視用の光源としても機能するようになっている。

【0046】15は検出器14によって細胞の通過が検出されたときにイメージインテンシファイア12のゲートを開くためのトリガ信号を出力する信号処理部である。この信号処理部15は、検出器14で検出した散乱光によって細胞が撮像エリアに入ったことを確認する。すなわち、信号処理部15は、検出器14で検出された散乱光の強度やパルス幅などをあらかじめ記憶した値と比較し、その細胞を撮像するべきか否かを判定する。そして、その細胞が撮像するべき細胞である場合には、イメージインテンシファイア12に対してゲートを開けるための信号を送出する。なお、細胞の選別撮像については、特開平5-119035号公報に記載の方法を参考にすることができる。

40 【0047】細胞がフローセル1の撮像エリアを通過することを検出するための細胞通過監視系は、常時発光光源（この実施例においては励起光源3が兼用されている）と、細胞通過監視用の検出器14から構成される。

【0048】このような構成において、細胞の撮像は一つの細胞に対して、異なる二方向から行う。第1対物レンズ5と第2対物レンズ6で得られた蛍光像は、第1ミラー7と第2ミラー8でそれぞれ反射され、さらに第3ミラー9で反射されて、イメージインテンシファイア12の光電面の片側に結像する。微弱な2つの蛍光像は、イメージインテンシファイア12で数万倍程度に増幅さ

れて、リレーレンズ13を介して撮像部10で撮像される。

【0049】実際には、細胞通過監視用の検出器14で、撮像したい細胞が撮像エリアに入ったことが検出されると、イメージンテンシファイア12のゲート（光シャッター）が開けられ、ある短い一定時間だけ動作してブレのない蛍光像が撮像される。撮像部10によって撮像された蛍光像は、ビデオ信号として画像処理部11に渡されて処理される。

【0050】本例では、二つの蛍光像を、一つのイメージンテンシファイア12及びビデオカメラで撮像するようにしているので、コストアップを抑制することができる。

【0051】本実施例では、一つの細胞に対して異なる二方向から2つの蛍光像を同時に撮像することを特徴としている。このようにすることで、撮像系の光軸の奥行き方向に二つの蛍光発光点が重なって位置する細胞でも、二つの発光点の識別が可能になり、正確な発光点の計数ができるようになる。

【0052】撮像系の二つの方向の間の角度は特に限定はなく、測定する対象によって最も適したものを選択すればよい。また、細胞の流れの方向に対して撮像系の角度をどのように設定するかということについても特に限定はない。しかし、測定精度を向上させるために、流れてくるどの細胞に対しても、二つの撮像系で得られる細胞像が常に同じ角度から撮像したものである必要がある場合には、以下のように設定する。

【0053】すなわち、試料流の断面が円形または正方形である通常のシースフローの場合、細胞通過監視系があるときには、細胞が撮像される位置がほぼ一定なので、どのように設定しても問題はない。一方、細胞通過監視系がないときには、試料流の軸に対して、二つの撮像系の軸がなす平面が垂直になるようにする。

【0054】平面シースフローの場合、試料流を横切る直線状の細胞通過監視系があるとき（細胞が撮像される位置はその直線上である）には、光軸及び試料流の流れ軸を含む平面上に二つの撮像系を設定する（図1参照）。測定精度や分析細胞数の観点からは、平面シースフローセルを用いて細胞通過監視系を付加したものが最も現実的である。

【0055】図2は撮像画面の例を示す説明図であり、染色体の数的異常を検査する目的で、FISH処理、すなわち蛍光標識したDNAプローブを染色体にハイブリダイズさせた時に得られる蛍光の撮像画面の例を示すものである。図2の（a）は本実施例のように二方向から撮像した蛍光像の例を示し、図2の（b）は図2の

（a）と同じ細胞を従来のIFCMによって一方向からのみ撮像した蛍光像の例を示す。

【0056】図2（a）において、上側の像は図1の第1対物レンズ5によるもので、下側のものは第2対物レ

ンズ6で撮像したものである。この例では、発光点が3箇所ある。上側の像ではちょうど光軸の方向に左側の発光点が重なってしまっているために、この像からは発光点は2箇所しか観察されない。しかし、角度の異なる方向から観察した像（下側）では3箇所の発光点が観察できるので、その細胞は3箇所の発光点があることが分かる。図2（b）では、（a）の上側の像と同じものが得られ、この像からは発光点が3箇所であることが認識できない。

【0057】本例では細胞通過監視系を付加しているが、細胞通過監視系がなくても実施は可能である。ただし、撮像効率や、測定精度（上記の撮像の角度の記載を参照）の点からはあまり現実的ではない。また、細胞通過監視用の光源を励起用光源3と共用しているが、細胞通過監視用の光源を別に設置してもよい。

【0058】細胞通過監視用の光源を別に設置する場合には、励起用光源3に、例えばパルスレーザ、Xeフラッシュランプ等のパルス発光光源を使用することにより、ゲート付きでない通常のイメージンテンシファイア12を使用することができる。発する蛍光が非常に強い場合には、イメージンテンシファイア12なしで、通常のビデオカメラだけで撮像することもできる。

【0059】本例では、前記したように、励起光を落射方式で照射している。この場合、励起光は撮像エリア全体を均一に照射する必要があり、照射強度の密度を上げるには限界がある。そこで、図3に示すように、励起光をフローセル1の側面から照射するようにしてもよい。図3においては、紙面表裏方向が試料液2の流れ方向である。

【0060】図4の（a）及び（b）は、このように、励起光をフローセル1の側面から照射するようにした場合（以降、この方式を側射方式と呼ぶ）の撮像エリア付近の励起光の照射状態を示す説明図である。図4の

（a）は励起光照射領域を示す説明図、（b）は励起光照射領域の中央部の断面を示す説明図である。これらの図において、41は細胞、42は励起光照射領域、43は撮像エリア、44は細胞通過監視領域である。矢印45は励起光の照射方向を示している。

【0061】励起光は、撮像エリア43の縦方向より十分に大きな長径と、撮像する細胞の厚さより十分に大きい短径をもった楕円形状で、撮像エリア43中では照射強度が均一になるように照射される。このようにすることで、フローセル1の厚み方向に励起光を絞ることができるので、励起光の単位面積当たりの照射強度を上げることができ、よりS/Nのよい蛍光像が得られるようになる。さらに、撮像エリア43のある領域、例えば細胞通過監視領域44の近傍に限定すれば、より励起光を絞り込んで照射できるので、さらに有利になる。

【0062】なお、図3では、試料流の軸と二方向の軸からなる平面が垂直になるようになっているが、これは

作図上の問題で、この向きをどのように設定するかは上述したとおりである。また、細胞通過監視は、細胞の側方散乱光で行っているが、これに限定されるものではない。

【0063】上述の図1及び図3の例では、蛍光像の撮像を行うようにしていた。しかし、光源およびフィルター（図示していない）の選択と照明の強度およびイメージンスファイア12のゲインを適切に設定することで、散乱光像を撮像することができる。散乱光の強度が十分に強い場合、イメージンスファイア12を使用しなくても、明るい散乱光像を撮像することができる。

【0064】図5に透過光像を撮像する場合の例を示す。図中、3aは透過光像撮像用の光源、16は細胞通過監視用の常時発光光源である。本例では細胞通過監視用の光源16は、透過光像撮像用の光源3aとは別になっている。17はダイクロイックミラーである。

【0065】検出器14は、例えばフォトダイオードや一次元イメージセンサ（ラインセンサ）等である。この例では、検出器14で透過光または前方散乱光を検出しているが、側方散乱光を検出するようにしてもよい。

【0066】光源16は、例えばLD、LED、SLDなどの連続発光タイプの光源である。この光源16の波長は可視域でない方が望ましいが、とくに限定はない。透過光像撮像用の光源3aは、例えばパルスレーザや、Xeフラッシュランプなどのパルス発光タイプの光源であり、ランダムトリガー動作が可能なものである。

【0067】このような構成において、細胞通過監視用の光源16からの光は、ダイクロイックミラー17で反射されて、フローセル1における試料流の細胞通過監視領域34を照射する。検出器14と信号処理部15により、目的とする細胞が撮像エリア33に入ったことが検出されると、透過光像撮像用の光源3aにトリガーがかけられ、光源3aが発光する。照明光はダイクロイックミラー17を透過してフローセル1中の細胞を照明する。

【0068】細胞の透過光像は図1で述べたのと同様の経路で撮像部10に至る。つまり、異なる角度の二方向の透過光像が撮像部10の受光面上に結像され、一つの細胞に対して、二つの透過光像が撮像される。図5では試料流の軸と撮像系の二方向の軸からなる平面が垂直になるようになっているが、これは作図上の問題で、この向きをどのように設定するかは上述したとおりである。

【0069】この装置を用いると、例えば、白血球を測定した場合に、従来のIFCMでは好中球が分葉核球であるのか桿状核球であるのかを区別することが困難であったが、それらが区別できるようになる。

【0070】なお、図1、図3及び図5で説明した例において、変更可能な構成は以下の通りである。フローセル1は、断面形状が長方形あるいは楕円形の平面シース

フローセルを用いてもよいし、断面形状が円形の通常の丸シースフローセルを用いてもよい。また、透過光像撮像用の光源3aは、パルス発光タイプのものを用いてもよいし、連続発光タイプのものを用いてもよい。

【0071】連続発光タイプの光源を用いる場合には、撮像部10の手前にゲート機能付きのイメージンスファイア12を配置する。光源3aに連続発光タイプのレーザを用い、高速ゲート機能付きのイメージンスファイア12を使用した場合は、非常に高価なパルスレーザを使用しないのでコストアップを抑制できる。励起方式は、落射方式を採用することもできるし、側射方式を採用することもできる。

【0072】細胞通過監視系は、設けても、設けなくてもよい。細胞通過監視系を設ける場合には、この細胞通過監視用の光源は、励起用光源あるいは透過光像撮像用の光源と共用であってもよいし、別に設置してもよい。

【0073】実施例2

本発明の実施例2の構成を図6に示す。この実施例において、先の実施例1と同じ構成要素には同じ参照番号を付し、その説明を省略する。本実施例では、一つの細胞に対して焦点位置の異なる2つの蛍光像を同時に撮像することを特徴としている。

【0074】図中、21はコンデンサレンズ、22は第4ミラー、23は第5ミラー、24は第1結像レンズ、25は第2結像レンズ、26はコレクタレンズ、27はピンホール、28はイメージンスファイア12の前面に挿入されたフィルタである。ピンホール27は、細胞による散乱光だけを受光するために設けており、フローセル1のガラス壁面等で反射、屈折してくる光を極力受光しないようにするためのものである。フィルタ28は、細胞から発せられる蛍光波長にマッチした特性のものであり、細胞による側方散乱光やレーザ光による迷光を除去するためのものである。

【0075】フローセル1には平面シースフローセルを用いている。図6においては、紙面表裏方向が試料液2の流れ方向である。イメージンスファイア12にはゲート機能（光シャッター機能）付きのものを用いている。

【0076】本例では、励起用の光源3から発生されたレーザ光の光軸に対して、二つの撮像系が、90°方向とマイナス90°方向に配置され、この二つの撮像系で二つの蛍光像を同時に撮像するようになっている。それぞれの撮像系の細胞に対する焦点位置（ピント位置）は、図7に示すように、少しずつずらすようにしている。

【0077】図7において、51は第1対物レンズ5のピント位置、52は第2対物レンズ6のピント位置である。このようにして、一つの細胞に対し、ピント位置の異なる2つの蛍光像を得ることによって、撮像倍率が大きく被写界深度が浅い場合でも、細胞内の微小な蛍光発光部をより確実に捉えることができる。

13

【0078】例えば、撮像する細胞を白血球とすると、この白血球は光軸方向に10数 μm の厚さを持っている。この大きさの細胞を画面上で観察する場合には、二次元的に十分な分解能で撮像しようとする、対物レンズ5, 6は $\times 60$ 以上のものを使用する必要がある。これは撮像部10が例えばビデオカメラである場合には、受光面であるCCDのサイズに依存する。この時の被写界の焦点深度は約1.5 μm と計算される。

【0079】したがって、このように大きな白血球を一つの撮像系で撮像しようとする、得られる蛍光像は、焦点面で光軸方向に薄い領域にのみフォーカスが合った像であり、細胞が光軸方向に複雑な形状を持つ場合には、焦点面近傍以外は観察できないか、ぼやけた像となる。このことは、蛍光像撮像機能付きイメージングフローサイトメータをFISHのような測定に応用する場合は大きな問題となる。例えば、FISHの測定では、細胞の核に発光点が何ヶ所あるかを測定する。その時に、発光点が光軸に垂直な平面内に分布していて、かつその平面にフォーカスが合えば、全ての発光点を観察することができる。しかし、光軸方向に発光点が分布していた場合は、フォーカスの合った面の発光点は観察できるが、その面以外の位置にある発光点は、ほとんど観察できないか、あるいは、ぼやけた大きな発光点として観察される。そのため、発光点の正確な観察ができず、発光点の計数ができなくなる。

【0080】これを解決するために、本例では、二つの撮像系を、 90° 方向とマイナス 90° 方向に配置し、この二つの撮像系で、焦点位置（ピント位置）を少しずらして、二つの蛍光像を同時に撮像するようにしている。このようにすることで、細胞内に三次元的に分布している発光点をもれなく撮像することができる。

【0081】この実施例では、フローセル1に平面シースフローセルを用いているので、図4の(a)及び(b)に示したように、試料流の幅の狭い方向からレーザ光を細く絞って照射することができる。したがって、蛍光を励起するための照射強度を強くすることができ、S/N比の良い蛍光像を撮像することができる。

【0082】このような構成において、励起用の光源3から発生されたレーザ光の光軸方向に対して 90° 方向とマイナス 90° 方向に発せられた蛍光は、それぞれ、第1対物レンズ5と第2対物レンズ6によって集められ、第4ミラー22と第5ミラー23によって反射される。そして、一方の蛍光は、第1結像レンズ24から、第1ミラー7と第3ミラー9を介してイメージインテンシファイア12の入力面の片側に結像される。また、他方の蛍光は、第2結像レンズ25から、第2ミラー8と第3ミラー9を介してイメージインテンシファイア12の入力面のもう一方の片側に結像される。

【0083】イメージインテンシファイア12の入力面に結像された微弱な蛍光像は、数千倍から数万倍に増倍

14

された像として、イメージインテンシファイア12の出力面に現れる。この像を、リレーレンズ13を介して撮像部10で撮像することにより、明るい蛍光像が撮像される。このようにして、細胞内に三次元的に分布している発光点をもれなく撮像する。

【0084】イメージインテンシファイア12は、上述したように、移動している細胞に対してブレの無い蛍光像を得るために、ゲート機能付きのものをを用いており、細胞がレーザ光照射エリアに移動してきた時の一瞬だけこのゲートを開くように制御する。

【0085】なお、本例においては、ゲート機能付きのイメージインテンシファイア12を用いているが、後述するように、パルスレーザやキセノンランプのようなパルス発光タイプの光源を用いることによって、ゲートなしで、あるいはイメージインテンシファイアなしでブレの無い蛍光像を得ることもできる。

【0086】細胞通過監視系では、励起光照射エリア（撮像エリア）に移動してきた細胞や微生物を確実に撮像するために、試料流2に照射された光による細胞や微生物の散乱光を検出器14で検出し、その検出信号を基にして、イメージインテンシファイア12のゲートを開く。すなわち、光源3からの励起光照射用のレーザ光による前方散乱光をコレクタレンズ26で集光し、ピンホール27を介して検出器14で受光する。フローセル1のガラス壁面等で反射、屈折された光はピンホールで除かれ、細胞による散乱光だけが検出器14で受光される。検出された信号は、信号処理部15に渡され、イメージインテンシファイア12のゲートを開くための制御信号が作られる。

【0087】図8は検出器14による散乱光検出信号の例を示す説明図である。信号処理部15での処理により、有効な細胞だけを選別して撮像することが可能である。すなわち、対象とする細胞や血球に比較して、微小なゴミや細胞の小片は小さく、散乱光強度は弱い。このことを利用して、散乱光検出信号の大きさから対象とする細胞かどうかを判断することができる。

【0088】具体的には、図8に示すように、散乱光検出信号の振幅が規定のスレシホールドレベル以上であるかどうかを比較して、2値化信号を得る。一方、細胞や微生物がちょうど励起光照射エリアにある時にイメージインテンシファイア12のゲートを開く必要があり、そのために、散乱光検出信号のピークを検出し、ピーク検出信号を得る。

【0089】そのピーク検出信号と上記2値化信号とを用いて、イメージインテンシファイア12のゲートを開くためのI、I₁ゲート制御信号を作る。イメージインテンシファイア12のゲートを開いておく時間は、ブレの無い蛍光像を得るために短くする必要がある。試料流の流速が、例えば100mm/秒である場合には、数 μ 秒だけゲートを開くように制御する。

【0090】図9は励起用の光源3としてパルス発光タイプのものを用いた場合の例を示す説明図である。この図において、29は細胞通過監視用の連続発光タイプの光源、30はコリメータレンズ、31はダイクロイックミラー、32はパルス発光タイプの光源3より発する光をカットするためのフィルタである。

【0091】パルス発光タイプの光源3としては、例えばパルスレーザやキセノンフラッシュランプがある。一般的にパルスレーザは、数n秒以下の一瞬の間に強力な光を発することができるので、試料流の流速が数m/秒と速くても、ブレのない像を得ることができ、この場合には、試料流を偏平な流れにしなくても、単位時間当たりの分析量をかせぐことができる。また、蛍光を増増するためのイメージインテンシファイア12を用いなくても、普通のビデオカメラで蛍光像が得られる場合もある。

【0092】本例では、細胞通過監視系を設けている。そして、励起用の光源3がパルス発光タイプのものであるため、細胞通過監視用として、連続発光タイプの光源29を別に設け、この連続発光タイプの光源29によって細胞の散乱光を検出するようにしている。この連続発光タイプの光源29としては、例えば近赤外線を照射する半導体レーザを使用することができる。

【0093】このような構成において、細胞通過監視用の光源29から照射された光は、コリメータレンズ30によって平行光にされた後、ダイクロイックミラー31で反射され、コンデンサレンズ21で絞られて、フローセル1内を流れる試料流に照射される。

【0094】細胞による散乱光は、コレクタレンズ26で集光され、フィルタ32を透過し、ピンホール27を介して検出器14で受光される。検出器14から出力された散乱光信号は、図6で示した例の場合と同様に信号処理部15によって信号処理され、対象とする細胞がちょうど撮像エリアにきた時に、信号処理部15からパルス発光タイプの光源3に対し、光源3を発光させるためのトリガ信号が供給される。

【0095】パルス発光タイプの光源3から光が照射されると、光源3の光軸に対して90°の方向とマイナス90°の方向に配置された二つの撮像系によって、二つ蛍光像が1台の撮像部10の受光面に結像される。撮像部10によって撮像された蛍光像は、ビデオ信号として画像処理部11に渡され、得られた蛍光像に対して各種の画像処理が行われる。

【0096】本例においては、イメージインテンシファイア12を用いているが、細胞から発せられる蛍光が強い場合には、イメージインテンシファイア12を用いなくても蛍光像を撮像することができる場合がある。ただし、パルス発光タイプの光源3を用いている場合には、イメージインテンシファイア12としてゲート機能を有していないものでも使用可能である。

【0097】図10は蛍光の撮像画面の例を示す説明図であり、染色体の数的異常を検査する目的で、蛍光標識したDNAプローブを染色体にハイブリダイズさせた時に得られる蛍光の撮像画面の例を示すものである。

【0098】この撮像画面の例は、左半分は対物レンズ5によって光軸の90°方向から見た蛍光像であり、右半分は対物レンズ6によって光軸のマイナス90°方向から見た蛍光像であり、1台の撮像デバイス（イメージインテンシファイア12と撮像部10の組み合わせ）で同時に撮像された例である。

【0099】左側の像では、核の右上と左上に蛍光発光部が確認されるが、右側の像では、核の左上の発光部は確認されず、核の下部に蛍光発光部が確認される。この例では、左側あるいは右側の蛍光像だけでは、2個所の蛍光発光部しか認識することができないが、左右2つの蛍光像を処理することによって、左の像の左上の発光部と右の像の右上の発光部とは同一の発光部とみなし、合計3個所の蛍光発光部が核内に存在すると認識することができる。

【0100】実施例3

本発明の実施例3の構成を図11に示す。この実施例において、先の実施例1及び実施例2と同じ構成要素には同じ参照番号を付し、その説明を省略する。本実施例では、一つの細胞に対して、焦点位置の異なる複数の蛍光像を時間的にずらして撮像することを特徴としている。

【0101】図中、33は対物レンズであり、34はダイクロイックミラーである。図11においては、紙面表裏方向が試料液2の流れ方向である。励起用の光源3としては、Arレーザのような連続発光タイプのレーザ光源を用いており、この光源3からの光は、ダイクロイックミラー34で反射させて、落射方式で試料流を照射するようになっている。

【0102】イメージインテンシファイア12にはゲート機能付きのものを使用し、周期的にイメージインテンシファイア12のゲートを動作させる。イメージインテンシファイア12のゲートの動作時間は、試料流の流速によって変化するが、得られる蛍光像にブレがなく、かつ、できるだけ明るい蛍光像が得られる時間である。例えば、試料流が100mm/secである場合には、3μsec程度の露光時間となる。

【0103】イメージインテンシファイア12が動作している時に、蛍光染色された細胞がフローセル1の撮像エリアに存在した場合は、細胞に含まれる蛍光物質が励起され、それより発した非常に微弱な蛍光は、イメージインテンシファイア12で数万倍に増幅されて、リレーレンズ13を介して撮像部10で撮像される。通常、イメージインテンシファイア12の動作は、撮像部10が例えばビデオカメラである場合には、カメラのビデオレートに同期させて行うので、30回/secである。

【0104】図12はフローセル1周辺を横からみた場

17

合の構成を示す説明図である。なお、この図においては、試料流は紙面上下方向に流れるようになっている。通常のイメージングフローサイトメータでは、平面フローセルを用いており、試料液2の流路は光軸に対して垂直に設定されている。これは細胞が撮像エリアのどの部分を通過しても細胞の同じ部分にフォーカスを合わせるためである。

【0105】本例では試料流（試料液2の流れ）と光軸とを含む平面内で、試料流が傾斜するように、すなわち試料流が対物レンズ33の焦点面に対して傾斜するように設定する。この場合、図12(a)に示すように、フローセル1そのものを傾斜させて取り付けてもよいし、図12(b)に示すように、フローセル1に対して試料流が斜めになるように作製されたフローセルを用いてもよい。

【0106】このような構成により、フローセル1中を細胞が試料流に沿って移動していくに従い、対物レンズ33の焦点面に対する相対位置（すなわち、対物レンズ33との距離）が変化する。したがって、対物レンズ33の焦点面を斜めに横切るように移動していく細胞に対して、時間をずらして複数回撮像することによって、一つの細胞に対して、フォーカスの合う位置のずれた像が得られる。

【0107】この状態をイメージインテンシファイア12のゲートを開けている時間を長くして撮像すれば流れた像になってしまうので、撮像部10にビデオカメラを用いているのであれば、高速ゲート機能付きイメージインテンシファイアを使用して、ビデオカメラの1フレームの間にゲートを何度か開くようにする。そうすることで、1フレーム中にフォーカス位置のずれた細胞像をいくつかが得ることができる。この構成の場合、フォーカス位置のずれの量は、フローセル1の取り付け角度を変更するだけで比較的簡単に変更することができる。

【0108】図13は細胞が撮像される部分の拡大図を示す説明図である。この図において、61は試料流の方向、62は対物レンズ33の焦点面であり、この図に示すように、一つの細胞に対して、フォーカス位置の異なる複数の蛍光像を得る。

【0109】図14は撮像画面の例を示す説明図であり、染色体の数的異常を検査する目的で、FISH処理、すなわち蛍光標識したDNAプローブを染色体にハイブリダイズさせた時に得られる蛍光の撮像画面の例を示すものであり、3箇所が発光する白血球を測定した場合に得られた画像の例を示したものである。

【0110】この図において、(a)は撮像エリア内でイメージインテンシファイア12を3回動作させて得られた画像の例である。(b)は従来のイメージングフローサイトメータで得られる画像の例を示したものである。

【0111】図14(b)の従来例では、3箇所ある発

18

光点の内、2つの発光点（右上）が光軸方向に重なっている。従来のイメージングフローサイトメータを用いて測定を行った場合は、フォーカスの合っている面にある発光点は鮮明に観察されるが、焦点面でない発光点は非常にぼやけて発光強度の弱い像として観察される。そして、上下方向に重なっている二つの発光点は一つの発光点として観察される。すなわち、この例では、ぼやけた一つの発光点として観察される。

【0112】それに対して、図14(a)の本例の画像では、全ての発光点が鮮明で、かつ、光軸方向に重なっている発光点も異なる焦点面で鮮明に観察できることから、別の発光点として認識できる。すなわち、本例では、一つの細胞に対して、異なる焦点面で数枚の像を撮像して、一枚の画像として画像処理部11に出力する。画像処理部11では、得られた蛍光像に対して各種の画像処理を行う。

【0113】試料流の傾斜角は被写界の焦点深度、細胞の大きさ等によって決定される。イメージインテンシファイア12のゲートを動作させる間隔は、流速等によって決定される。また、励起用の光源3の照射領域は撮像エリア全体を均一に照射しなければならない。

【0114】この例では蛍光画像の撮像を行ったが、蛍光像の撮像だけに限らず、図11のダイクロイックミラー34をビームスプリッタに変更することによって、散乱光像を撮像できるようになる。この場合、散乱光は蛍光に比較して強度が強いので、イメージインテンシファイア12の動作時間を短くして、蓄積時間を短くすることができる。したがって、試料流の流速を速くすることができるので、単位時間当たりの分析量を増加させることができる。

【0115】また、この例では、励起用の光源3に連続発光タイプの光源を用い、イメージインテンシファイア12に高速ゲート付きのものを使用しているが、励起用の光源3に繰り返し周波数が数千pps（パルス/秒）以上の、例えば半導体励起固体パルスレーザなどのパルス発光タイプの光源と、高速ゲートでない通常のゲート機能付きのイメージインテンシファイア12を使用してもよい。また、非常に出力エネルギーの高いパルス発光タイプの光源を用いた場合には、イメージインテンシファイア12を使用しなくても蛍光像の撮像が可能である。

【0116】図15は細胞通過監視系を付加した場合の例を示す説明図である。図11ではイメージインテンシファイア12のゲートを周期的に動作させていたが、細胞濃度が低い場合は、イメージインテンシファイア12を動作させた時に、細胞がちょうど撮像エリアに存在している確率は低く、撮像効率が低い。また、例えばイメージインテンシファイア12を3回動作させたとしても、撮像される位置が一定でなく、本来3つあるはずの像が2つ又はそれ以下の場合も有り得る。そこでこの例

のように細胞通過監視機能を付加する。

【0117】この場合、細胞通過監視用の光源と励起用の光源3は共用している。そして、細胞通過監視は前方散乱光または透過光で行っている。なお、細胞通過監視は側方散乱で行うようにしてもよい。細胞通過監視用の検出器14はフォトダイオードまたはラインセンサ等を用いる。

【0118】図16は細胞通過監視領域と撮像エリアの関係を示す説明図である。この図に示すように、細胞通過監視領域44は細長い矩形とし、試料流2の流れに対して垂直で、かつ撮像エリア43の幅とほぼ同じか、それ以上で、撮像エリア43内の試料流の上流の側に設置する。なお、この位置は中央でもよいが、この方が実際的である。

【0119】検出器14にフォトダイオードを使用した場合は、スリットを使用して、細胞通過監視領域44を監視するようにし、ラインセンサを使用する場合は、ラインセンサの監視領域が細胞通過監視領域44となるようにラインセンサを配置する。

【0120】検出器14からの信号は信号処理部15に送られる。信号処理部15によって、イメージインテンシファイア12をわずかの時間差で複数回動作させるためのトリガ信号が作り出される。この信号処理部15では、検出器14から出力される散乱光の強度によって、細胞の大きさを判定することもでき、撮像エリア43に入った細胞がごみ等であれば撮像しないように制御することができる。

【0121】細胞通過監視系と信号処理部15によって、細胞が撮像エリアに入ったことが検出されれば、イメージインテンシファイア12のゲートが開かれてイメージインテンシファイア12はわずかの時間差で複数回動作し、図14(a)で示したような同一細胞に対して複数の蛍光像の写った画面が得られる。

【0122】この例においては、撮像するためにイメージインテンシファイア12を複数回動作させるようにしている。したがって、細胞濃度が低い場合には、確率はかなり低いと考えられるが、一連の撮像の最後の方の撮像のためにイメージインテンシファイア12を動作させた時に、次の細胞が撮像エリア43に入ってきてしまい、そのため、最初の方で撮像した像と重なって撮像されてしまう場合が考えられる。

【0123】細胞通過監視系がない場合には、得られた画像より細胞の重なりを判断するしかないが、細胞通過監視系がある場合には、その細胞通過監視系で細胞の重なりを判定することができる。具体的な例を以下に示す。

【0124】まず、細胞通過監視系の検出器14にフォトダイオードを用いた場合を説明する。試料流の流速を 100mm/sec とし、一つの細胞に対してイメージインテンシファイア12の動作回数を3回とする。そし

て、イメージインテンシファイア12の動作時間は $5\mu\text{sec}$ とし、動作間隔は $250\mu\text{sec}$ とする。

【0125】検出器14はフォトダイオードであるので、スリットを設けて細胞通過監視領域44を撮像エリア43の一部に限定している。検出器14により細胞の通過の信号が信号処理部15に入力されると、信号処理部15はイメージインテンシファイアを動作させるためにトリガ信号を出力する。

【0126】ある撮像フレームで撮像が行われたとすると、そのフレーム期間中でイメージインテンシファイア12の3回目（最終）動作が終わるまでに、次の細胞の通過が検出された場合は、最初に撮像された像に後で検出された細胞の像が重なる可能性があるため、このフレームで撮像された像は無効にする。すなわち、フォトダイオードで細胞通過監視を行う場合は、前の細胞の撮像中に次の細胞が撮像エリアに入ったことが検出できるので、そのようになった場合は、どちらの細胞像も無効にする。

【0127】図17はフォトダイオードを用いた場合の細胞の重なりを検出例を示すものであり、フォトダイオードの検出信号とその時に得られる画面の例を示す説明図である。図17の(a)はフォトダイオードの検出信号とイメージインテンシファイア12の動作信号を示し、(b)は撮像した画面の例を示している。

【0128】図17(a)において、フォトダイオードの検出信号によって細胞の通過が検出されると、イメージインテンシファイア12に動作信号が送られ、イメージインテンシファイア12は、例えば3回動作する。図に示す禁止領域Kの間に細胞の通過が検出されなければ撮像された三つの蛍光像は有効である。例えば、禁止領域Kではないタイミングで細胞の通過が検出された場合は、たとえ細胞が前の細胞と同じ位置を流れても重なることはないため、三つの細胞だけを画像処理で切り出して有効とすればよい。

【0129】図17(b)において、 L_1 は、 $L_1 = v \cdot t_1$ (v :細胞の流速)で表される。この例ではできるだけ有効になる細胞が多くなるように禁止領域を狭くしたが、細胞通過の監視位置や禁止領域の広さを変更することで常に画面には有効になる細胞だけが表示されるようにすることもできる。禁止領域の幅は細胞の流速、及びイメージインテンシファイア12の動作タイミング等によって決定される。

【0130】次に、細胞通過監視系の検出器14にラインセンサを用いた場合を説明する。撮像の条件は上記と同じとする。検出器14としてラインセンサを用いた場合は、細胞の大きさとともに撮像エリア43における細胞の通過位置を検出することができる。

【0131】ある撮像フレーム期間中でイメージインテンシファイア12の3回目（最終）動作が終わるまでに、次の細胞の通過が検出されても、最初に流れてきた

細胞と次に流れてきた細胞の位置が重なっていないことが確認できれば、最初に撮像した像は有効で、次の細胞を無効にすれば良い。二つの細胞の位置が少しでも重なっていることがわかれば両方の細胞像を無効にする。

【0132】図18及び図19はラインセンサを用いた場合の細胞の重なるの検出例を示すものであり、ラインセンサの検出信号とその時に得られる画面の例を示す説明図である。図18の(a)はラインセンサの検出信号とイメージインテンシファイア12の動作信号を示し、(b)は撮像した画面の例を示している。同じく、図19の(a)はラインセンサの検出信号とイメージインテンシファイア12の動作信号を示し、(b)は撮像した画面の例を示している。

【0133】図18の(a)及び(b)においては、イメージインテンシファイア12の3回目の動作時に次の細胞41bが撮像エリアに入ってきているが、位置が重なっていないので、最初の細胞41aの像を有効にして、次の細胞41bの像を無効にする。

【0134】図19の(a)及び(b)においては、次の細胞41dの流れる位置が前の細胞41cの位置と重なっているため、両方の細胞41c、41dの像を無効にする。

【0135】図20はフローセル1の側面から励起光を照射する方式(側射方式)を用いた装置の例を示す説明図である。励起光を落射方式で照射する場合には、撮像エリア全体に均一に励起光を照射するために励起光の照射領域を大きく広げることが必要である。そのためレーザービームを小さく絞込むことができず、単位面積当たりの照射強度の点で不利である。

【0136】本例では、その点を改善するためにフローセル1の側面から励起光を照射するようにしている。励起光は、図4の(b)に示したように、撮像エリア43の縦方向よりも十分に大きな長径と、撮像する細胞の厚さより十分に大きい短径をもった楕円形状で照射される。このようにすることで、図16に示すような形状で照射するよりも、単位面積当たりの照射光度を上げることができる。本例では細胞通過監視系が付加されており、両方散乱光で細胞の通過監視を行うようにしている。

【0137】

【発明の効果】この発明によれば、一つの粒子に対して、異なる複数の像を撮像するようにしたので、例えばFISHの測定においても、従来では検知できなかった3次元的に分布した微小な蛍光発光部を見落とすことなく検知することができ、精度の高い測定を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明によるイメージングフローサイトメータの実施例1の構成を示す説明図である。

【図2】撮像画面の例を示す説明図である。

【図3】励起光をフローセルの側面から照射する例を示

す説明図である。

【図4】励起光をフローセルの側面から照射するようにした場合の撮像エリア付近の励起光の照射状態を示す説明図である。

【図5】透過光像を撮像する場合の例を示す説明図である。

【図6】本発明の実施例2の構成を示す説明図である。

【図7】二つの撮像系で二つの蛍光像を同時に撮像する場合の焦点位置を示す説明図である。

【図8】検出器による散乱光検出信号の例を示す説明図である。

【図9】励起用の光源としてパルス発光タイプのものを用いた場合の例を示す説明図である。

【図10】蛍光の撮像画面の例を示す説明図である。

【図11】本発明の実施例3の構成を示す説明図である。

【図12】フローセル周辺を横からみた場合の構成を示す説明図である。

【図13】細胞が撮像される部分の拡大図を示す説明図である。

【図14】撮像画面の例を示す説明図である。

【図15】細胞通過監視系を付加した場合の例を示す説明図である。

【図16】細胞通過監視領域と撮像エリアの関係を示す説明図である。

【図17】フォトダイオードを用いた場合の細胞の重なるの検出例を示す説明図である。

【図18】ラインセンサを用いた場合の細胞の重なるの検出例を示す説明図である。

【図19】ラインセンサを用いた場合の細胞の重なるの検出例を示す説明図である。

【図20】フローセルの側面から励起光を照射する例を示す説明図である。

【符号の説明】

- 1 フローセル
- 2 試料液
- 3 光源
- 4 レンズ
- 5 第1対物レンズ
- 6 第2対物レンズ
- 7 第1ミラー
- 8 第2ミラー
- 9 第3ミラー
- 10 撮像部
- 11 画像処理部
- 12 イメージインテンシファイア
- 13 リレーレンズ
- 14 検出器
- 15 信号処理部
- 16, 29 常時発光光源

23

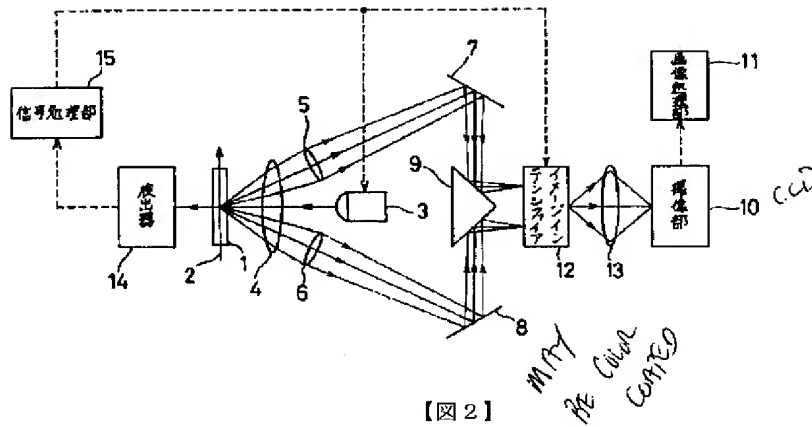
24

- 17, 31, 34 ダイクロイックミラー
 21 コンデンサレンズ
 22 第4ミラー
 23 第5ミラー
 24 第1結像レンズ
 25 第2結像レンズ
 26 コレクタレンズ
 27 ピンホール

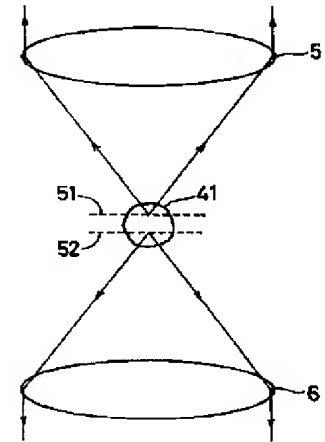
- 28, 32 フィルタ
 30 コリメータレンズ
 33 対物レンズ
 42 励起光照射領域
 43 撮像エリア
 44 細胞通過監視領域
 51 第1対物レンズのピント位置
 52 第2対物レンズのピント位置

【図1】

【図7】

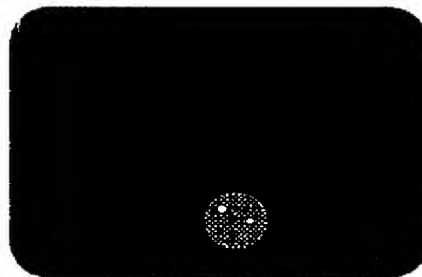
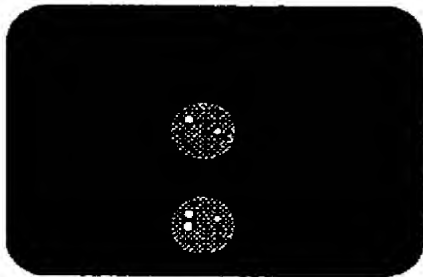


【図2】



(a)

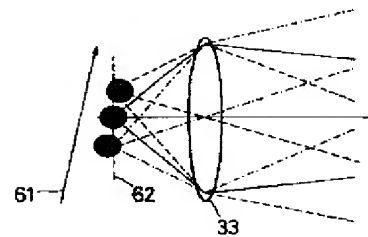
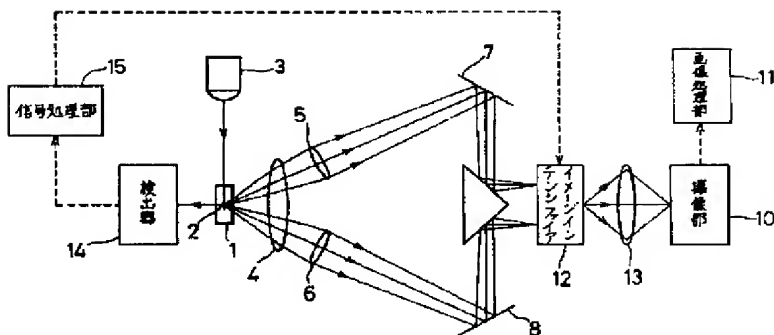
(b)



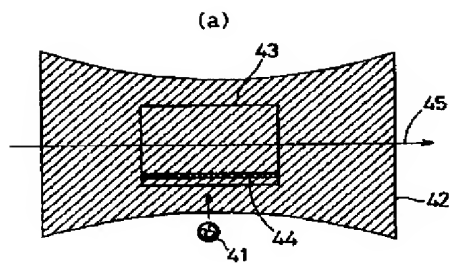
NOT ENOUGH LIGHT
 NOT ENOUGH TIME

【図3】

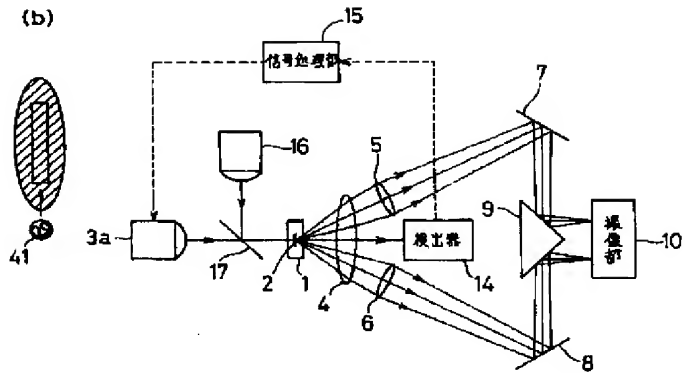
【図13】



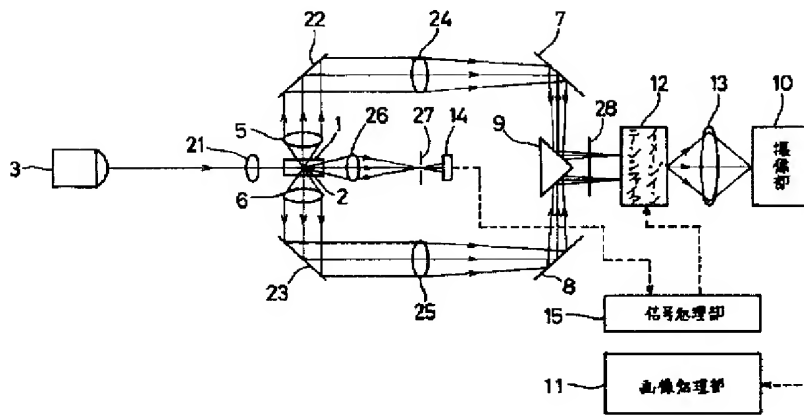
【図4】



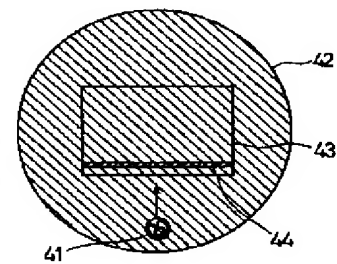
【図5】



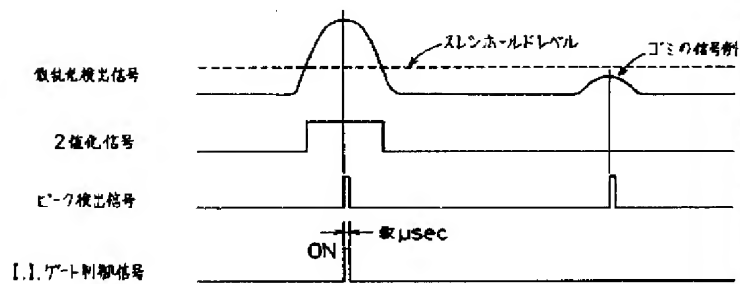
【図6】



【図16】



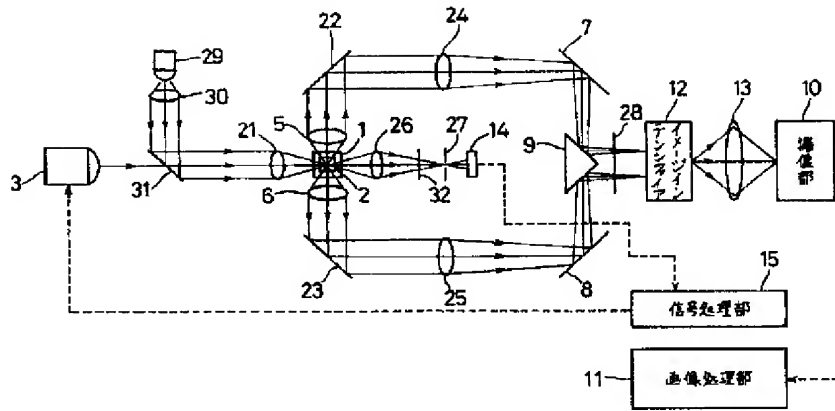
【図8】



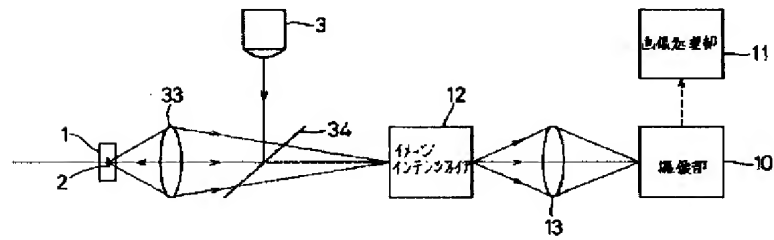
【図10】



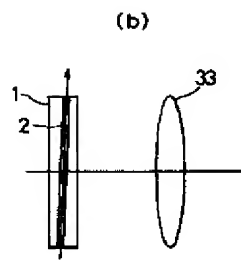
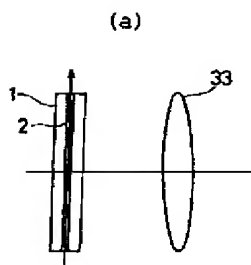
【図 9】



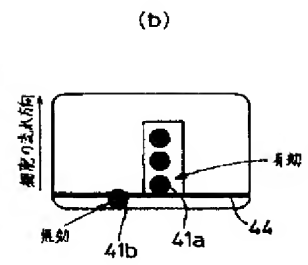
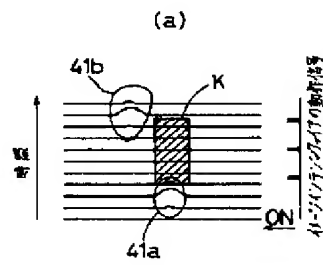
【図 11】



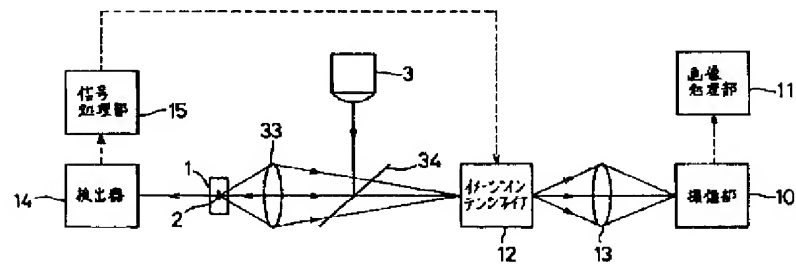
【図 12】



【図 18】

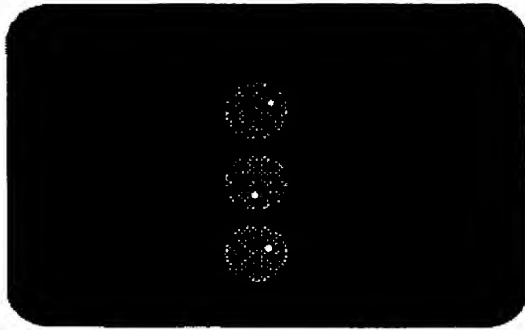


【図 15】

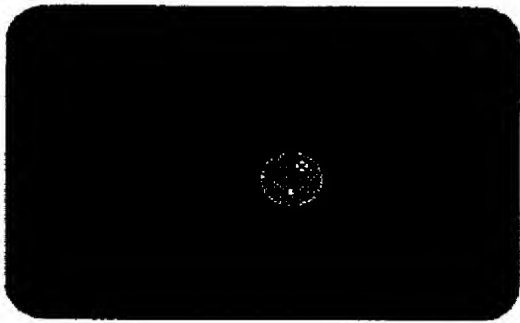


【図14】

(a)

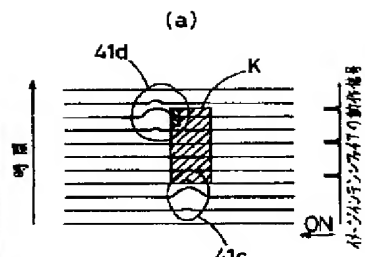


(b)

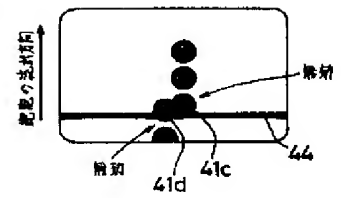


【図19】

(a)

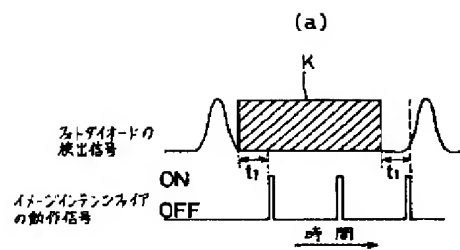


(b)

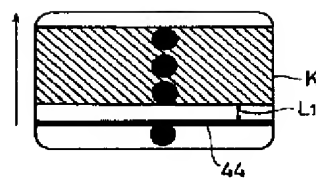


【図17】

(a)



(b)



【図20】

